CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA FLORE FONGIQUE MICROSCOPIQUE DU MAROC

I. — Le genre *Gonatobotrys* : quelques aspects morphologiques et physiologiques

par L. NAJIM, J.P. CLAUZET et M. KADIRI*

RÉSUMÉ. — Deux espèces de *Gonatobotrys*, le *G. simplex* et le *G. africana* sp. nov. ont été isolées pour la première fois au Maroc; dans la région d'Oulmes au Moyen Atlas, à 800 m d'altitude. Ces deux espèces [illegible] distinguent d'une part, entre elles, par leurs caractères morphologiques mais présentent toutefois quelques similitudes sur le plan physiologique; d'autre part, elles possèdent quelques particularités qui les différencient des espèces déjà décrites, en particulier pour le *G. africana*. Ces deux espèces [illegible] développent fréquemment en mycoparasites, dans nos régions, sur l'*Alternaria alternata*. Des tentatives de culture pure en l'absence de l'hôte (isolement monospore) et l'étude de leur ultrastructure ont permis d'apporter quelques précisions sur la systématique de ces espèces qualifiées de parasites biotropiques obligatoires.

SUMMARY. — Two species of *Gonatobotrys*, *G. simplex* and *G. africana* sp. nov., have been isolated for the first time in Morocco, in the Middle Atlas region at Oulmes, at 800 m of altitude. On one hand, these two species will be distinguished, one from the other, by their morphological characters, however, they present some physiological similarities; on the other hand, they have some particularities that differentiate them from already described species, particularly for *G. africana*. These two species develop frequently [illegible] mycoparasites, in our region on *Alternaria alternata*. Tentatives in pure cultures in absence of the host (monospore isolation) and study of their ultrastructure permit to carry some precisions on the systematic of these species qualified as obligatory biotropic parasites.

MOTS CLÉS : *Gonatobotrys*, morphologie, physiologie, systématique.

INTRODUCTION

Le genre *Gonatobotrys* dont la systématique a été révisée récemment par divers auteurs (ALI, 1975; WALKER & MINTER, 1981), comprend deux espèces : *Gonatobotrys simplex* et *G. complex*. Le *Gonatobotrys complex* [illegible] été

* Laboratoire de Mycologie, Faculté des Sciences, av. Ibn Batota, B.P. 1014. Rabat (Maroc).

décrit pour la première fois par WALKER & MINTER (1981). WHALEY & BARNETT (1963) ont montré que le *G. simplex* est un parasite biotropique de contact. Par ailleurs, HOCH (1977), dans une étude ultrastructurale concernant les relations entre ce champignon et l'un de ses hôtes, l'*Alternaria tenuis*, a montré l'existence de plasmodesmes au niveau de la zone de contact.

C'est en faisant un relevé systématique des espèces fongiques microscopiques, dans les vergers de Rosacées, dans la région d'Oulmès (Moyen-Atlas) que nous avons pu observer pour la première fois le genre *Gonatobotrys* au Maroc. Ces champignons ont été isolés en même temps que leur hôte : *Alternaria alternata*. Les précédents travaux de recensement de la flore fongique aérienne au Maroc n'ont pas fait mention de ce champignon car ils se limitaient essentiellement à la région de Rabat (CHABERT, 1968; CHABERT & NICOT, 1968) dont l'environnement est très différent de celui de la région d'Oulmès. Deux espèces de *Gonatobotrys*, le *G. simplex* et *G. africana* sp. nov., sont très fréquentes dans cette région du Maroc et leur hôte préférentiel est l'*Alternaria alternata*.

Des cultures pures de *Gonatobotrys* sur lame ou sur de la cellophane ont permis de distinguer les deux espèces de *G. simplex* et *G. africana* et d'apprécier certaines de leurs affinités physiologiques avec les différentes souches d'*Alternaria alternata*. Dans le présent travail, nous montrons l'existence des deux espèces de *Gonatobotrys*, leurs particularités physiologiques et morphologiques et les différentes variations qui se présentent.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Origine de la souche :

Les échantillons de *Gonatobotrys* sp. que nous avons observés, proviennent de la région d'Oulmès au Moyen-Atlas (150 km à l'Est de Rabat; 800 m d'altitude) où ils ont été récoltés en compagnie de leur hôte (de mars à juin 1981), soit directement sur les pommes en voie de pourrissement, soit par capture des spores sur des boîtes de Pétri contenant un milieu de culture pauvre : extrait de malt : 10 g/l; agar : 20 g/l et ouvertes dans les vergers de la région à 0,80 m du sol, pendant 24 h.

Culture pure et stockage des souches :

Un extrait cellulaire a été obtenu à partir de culture de mycélium d'*Alternaria alternata* en milieu liquide (extrait de malt à 2 %), maintenue en agitation. Au bout d'une dizaine de jours, le mycélium est recueilli, lavé, et déshydraté à l'étuve à 80°C. Le résidu sec est ensuite broyé dans un mortier en présence de tampon phosphate 0,15 M pH 6,8 à raison de 10 ml par mg de poids sec. Cette suspension est alors filtrée et stérilisée à l'autoclave. L'extrait ainsi obtenu est étalé à la surface du milieu de culture au moment de l'ensemencement à raison de 1 ml par boîte de Pétri.

Nous avons utilisé deux types de milieu de culture : un milieu constitué

d'extrait de malt (20 g/l), et d'agar (20 g/l) et un milieu comparatif mis au point par WHALEY & BARNETT (1963) : glucose (5 g/l), extrait de levure (5 g/l), et agar (20 g/l).

En ce qui concerne le stockage des deux espèces de *Gonatobotrys* nous avons procédé de deux manières différentes : la première est de les maintenir sur leur hôte vivant à une température de 3°C et de faire des repiquages tous les deux mois. La deuxième méthode est très délicate et présente toutefois, quelques risques, elle consiste à maintenir les deux souches en culture pure sur un milieu additionné d'extrait cellulaire de l'hôte. Cette dernière méthode permet d'obtenir un temps de stockage assez long, allant jusqu'à cinq mois.

Les cultures sont auparavant incubées pendant deux à trois jours à la température ambiante (23 ± 1°C) avant d'être transférées dans l'enceinte réfrigérée (3°C) pour la conservation.

Des cultures de ces différentes espèces ont été envoyées au Centraalbureau voor Schimmelcultures Baarn, pour être conservées et cataloguées.

Microscopie électronique à balayage :

De petits carrés de gélose supportant la culture ont été fixés au permanganate à 1 % dans un tampon à pH 6.8. Plusieurs lavages à l'eau distillée ont précédé une déshydratation progressive à l'acétone (25 %, 50 %, 75 %, 95 % et 100 %). Après avoir été séché par la méthode du point critique, le mycélium est déposé sur des supports en aluminium et métallisé avec une fine couche d'or.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

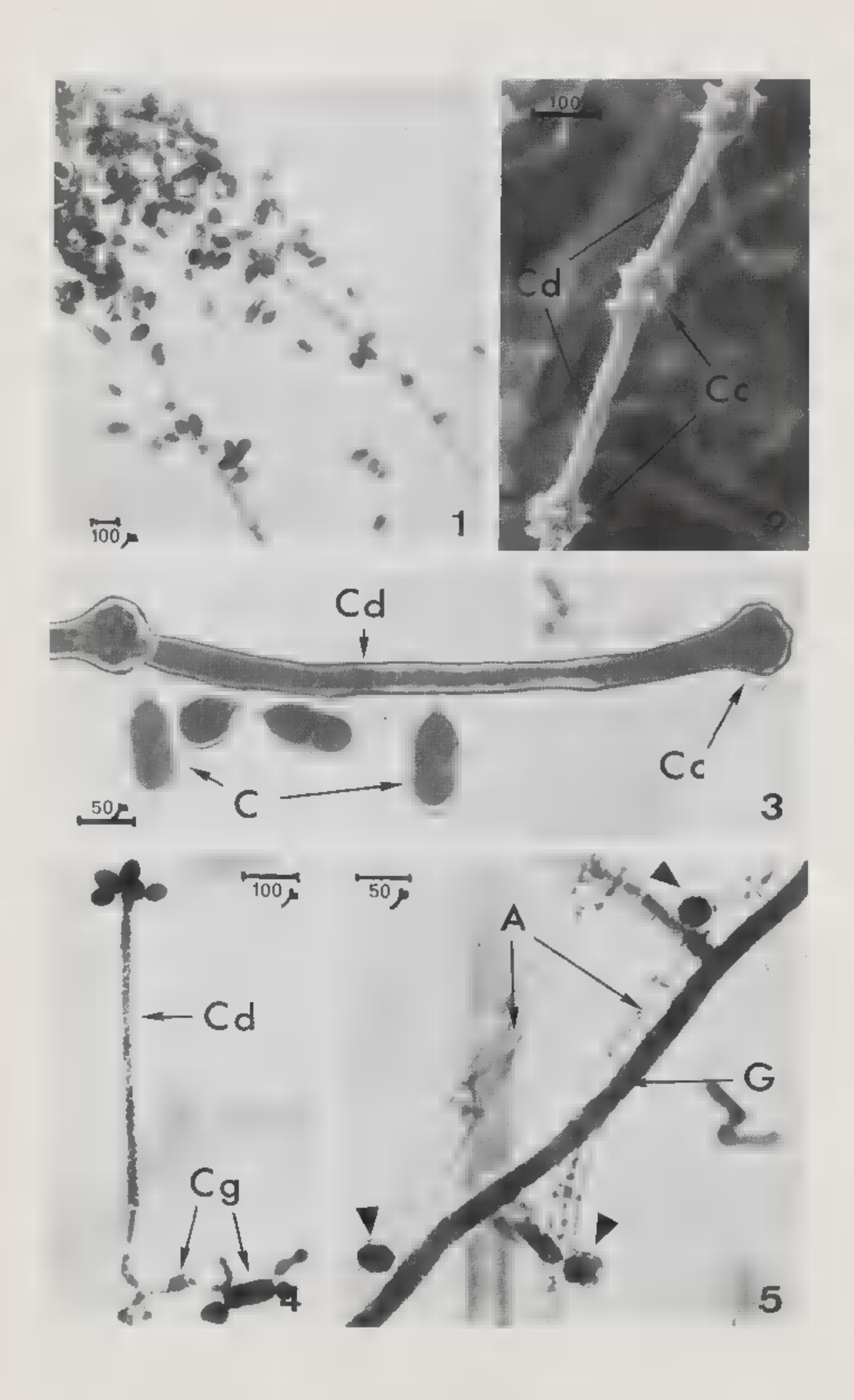
I - Aspects morphologiques

Le genre *Gonatobotrys* se caractérise par des colonies de couleur blanchâtre et devenant parfois orange en vieillissant. Le mycélium est formé de filaments rampant sur lesquels se différencient des conidiophores dressés, portant à intervalles plus ou moins réguliers des cellules conidiogènes; les conidies sont hyalines, non reliées en chaine (Pl. I, fig. 2 et 3; Pl. III, fig. 2 et 3).

WALKER & MINTER (1981) ont décrit deux espèces de *Gonatobotrys*, le *G. simplex* et le *G. complex*, qu'ils distinguent par le nombre de cellules par conidie. En effet, le *G. simplex* présente des conidies unicellulaires (Pl. I, fig. 1 et 3) alors que le *G. complex* présente des conidies bicellulaires.

Nous avons constaté que l'une de nos souches est plus proche morphologiquement du *G. complex* décrit par WALKER & MINTER (1981), mais en diffère par un ensemble de caractères qui font d'elle une nouvelle espèce : *Gonatobotrys africana* sp. nov. (Pl. IV).

– Les conidiophores du *G. africana* isolé au Maroc sont beaucoup plus ramifiés que ceux du *G. simplex* et les ramifications se forment souvent au niveau des cellules conidiogènes (Pl. III, fig. 4; Pl. IV).


100µ
1
100
Cd
Cc
Cd
Cc
C
50µ
3
100µ
50µ
A
Cd
G
Cg
4
5

— Les cellules conidiogènes du *G. africana* isolé au Maroc ont une forme beaucoup moins régulière, moins sphérique que celles du *G. simplex*, mais aussi que celles de l'holotype de *G. complex* décrit par WALKER & MINTER (1981) (Pl. I, fig. 2; Pl. III, fig. 2 et 3).

— Chez le *G. africana*, nous n'avons pas observé d'hétérogénéité conidienne et en particulier ces longues conidies de 30 à 40 microns, décrites par WALKER & MINTER (1981), représentant 25 % des conidies d'après ces auteurs (communication personnelle).

— Enfin, signalons la présence, avec une fréquence relativement faible toutefois, de conidies bicellulaires produites par le *G. simplex*; par contre, la présence de conidies unicellulaires (10 %) produite par *G. africana* isolé au Maroc semble être liée à l'ontogénie conidienne.

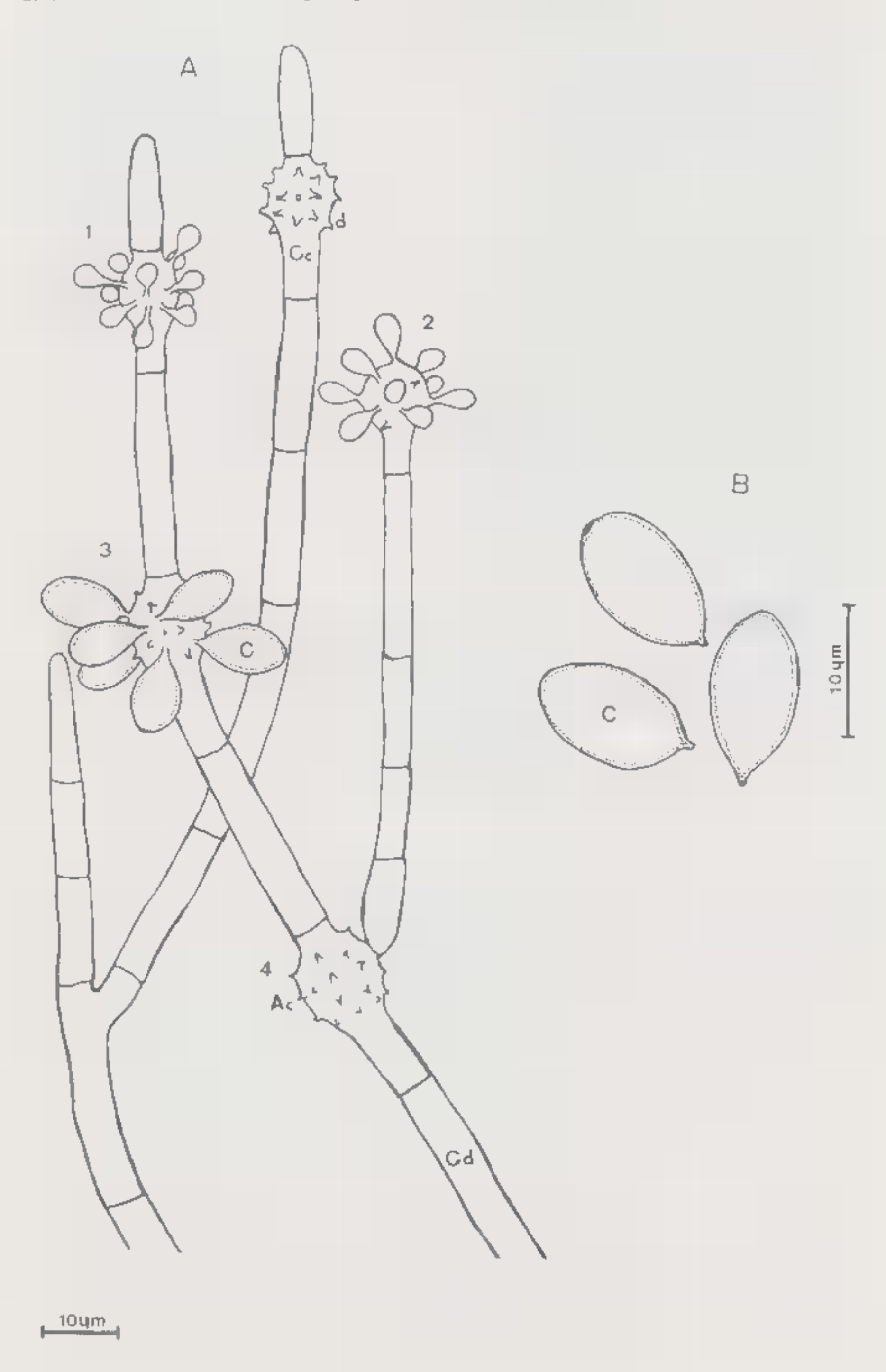
En conclusion, s'il ne semble faire aucun doute que le *G. simplex* isolé au Maroc correspond à l'holotype *G. simplex* Cda var. *levellei* Sacc. (WALKER & MINTER, 1981), il n'en est pas de même pour le *G. africana*; en effet, le type de ramifications, la forme des cellules conidiogènes, l'homogénéité morphologique des conidies, nous font penser que la souche isolée au Maroc correspond à une espèce différente de celle de l'holotype *G. complex* Jane WALKER & MINTER.

Gonatobotrys africana Larbi NAJIM, Jean-Paul CLAUZET et Mohamed KADIRI sp. nov. (Pl. IV)

Espèce récoltée à Oulmès, Moyen-Atlas en présence d'*Alternaria alternata*, dans des vergers de Rosacées. Des cultures, en présence de l'hôte ont été envoyées au Centraalbureau Voor Schimmelcultures à Baarn, pour y être cataloguées et conservées.

Planche I : *Gonatobotrys simplex*. — Fig. 1 : Microscopie photonique; aspect général du thalle. Fig. 2 : M.E.B., conidiophores (Cd), les cellules conidiogènes (Cc) sont hérissées de minuscules denticules provenant de la chute des conidies. Fig. 3 : Cellules conidiogènes (Cc) se différenciant au sommet du conidiophore (Cd), et devenant intercalaire par suite de la croissance apicale du conidiophore, tout en continuant à produire des conidies (C). Fig. 4 : Germination de conidies de *G. simplex* (Cg) en l'absence de l'hôte et de l'extrait cellulaire, montrant une conidie initiant un microcycle et une autre conidie ne produisant que des «bourgeons» lui donnant un aspect «lévuriforme». Fig. 5 : Relations entre *G. simplex* (G) et l'un de ces hôtes, *Alternaria alternata* (A), *G. simplex* émet de très courtes ramifications terminées par des cellules de contact (flèches) caractérisant ce mode de parasitisme.

Plate I : *Gonatobotrys simplex*. — Fig. 1 : general aspect of thallus. Fig. 2 : SEM, conidiophores (Cd), denticulate conidiogenous cells (Cc). Fig. 3 : Conidiogenous cells (Cc) at top of conidiophore (Cd), intercalated by apical growth of conidiophore, and always producing conidia (C). Fig. 4 : Germinating conidia (Cg) in absence of the host or of the cellular extract : one conidium is initiating a microcycle, and another one is only producing buds. Fig. 5 : Relationships between *G. simplex* (G) and one of its hosts, *Alternaria alternata* (A). Arrows : contact cells produced by *G. simplex*.


A
1
Cc
d
2
3
C
4
Ac
Cd
10µm
B
C
10µm

Les colonies sont blanches, ou parfois légèrement orange dans les parties âgées. Le mycélium est large et hyalin, de 3 à 5 µm de diamètre, septé et relativement très ramifié. Les conidiophores ont 5 à 7 µm de diamètre et 1000 à 2000 µm de hauteur, ils sont dressés et très ramifiés comparés au *G. complex* décrit par WALKER & MINTER (1981). Les ramifications sont rares au niveau des ampoules conidiogènes dont le diamètre est de 7 à 12 µm, et qui sont espacées plus ou moins régulièrement sur le conidiophore.

Les conidies sont dans leur grande majorité bicellulaires (90 %), mais on trouve aussi des conidies unicellulaires (10 %) de taille légèrement plus réduite que les premières. Dans les conidies bicellulaires, la taille de la cellule apicale (extrême) est toujours de taille réduite ou au plus égale à celle de la cellule basale (ou proximale). La taille des cellules conidiennes est le caractère essentiel qui permet de distinguer le *G. africana* du *G. complex*, où la cellule basale (proximale) de la conidie est la plus réduite par rapport à la cellule apicale. Les conidies (5 x 14 µm) du *G. africana* sont régulièrement disposées sur l'ampoule conidiogène et insérées sur celle-ci par de longs denticules (3 à 5 µm), qui sont d'autant plus longs que les conidies qu'ils portent sont aux premiers stades de développement.

Le *G. africana* se distingue aussi de l'*Arthrobotrys* car les conidies sont au maximum bicellulaires, et ne présentent jamais de trappes; par contre, il développe des cellules de contact en présence de l'*Alternaria alternata*.

Gonatobotrys africana Larbi NAJIM, Jean-Paul CLAUZET et Mohamed KADIRI sp. nov. (Pl. IV).

Species in Oulmès, Medio in Atlante, in Alternariis alternatis in quibusdam Rosacearum Pomariis inventa.

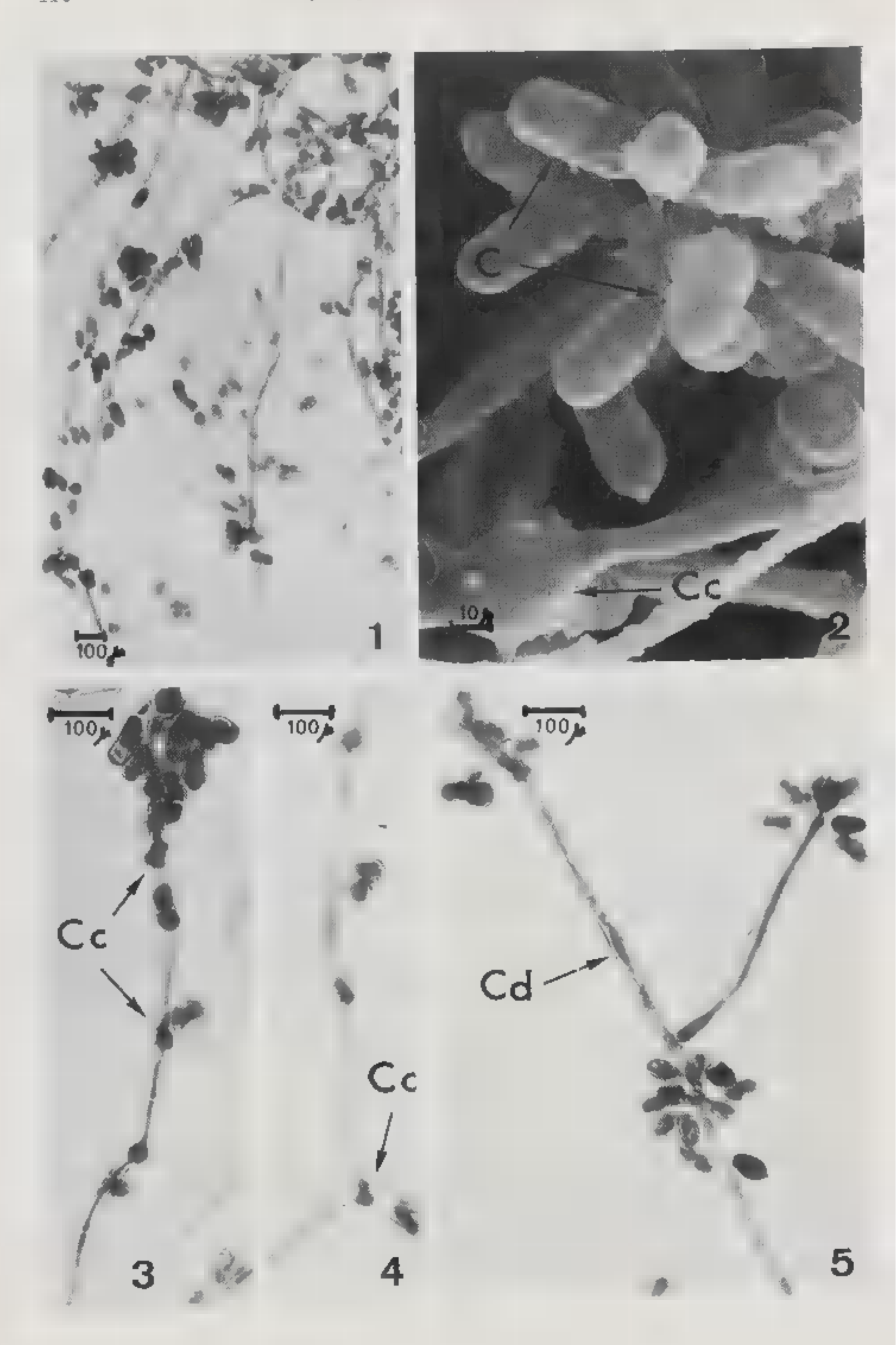
Coloniae ejus albae, aliquando autem in provectioribus aetate partibus subflammeae. Mycelium latum perlucidumque, in diametro 3 ad 5 µm, septatum et, si dici potest, maxime ramosum.

Conidiophori in diametro 5 ad 7 µm, in altitudine autem 1000 ad 2000 µm, erecti maximeque ramosi si cum G. complici, A. WALKER & MINTER descripta (1981), comparatur.

Rami pauci in partibus ampullas conidiogenas ferentibus. Hae ampullae, in diametro 7 ad 12 µm, in conidiophoris magis vel minus paribus intervallis incorporatae sunt.

Planche II : *G. simplex.* — A : Aspect des conidiophores. 1, 2 et 3 : différents stades de développement des conidies. 4 : Ampoule conidiogène après la chute des conidies. Ac : ampoule conidiogène. Cd : conidiophore. Cc : cellule conidiogène. C : conidie. d : denticule. B : détail de quelques conidies.

Plate II : *G. simplex.* — A : Conidiophores. 1, 2 et 3 : different stages in development of conidia. 4 : conidiogenous bulbs. B : Some conidia.


C
Cc
10
100
1
2
Cc
100
100
100
Cc
Cd
Cc
3
4
5

Pleraeque conidiae bicellulariae aliquae unicellulariae, hae leviter parviores quam illae. In bicellulariis conidiis, cellula in apice posita plerumque minor quam altera in basi posita : aliquando autem magnitudine aequa, nunquam major. Cellularum conidiarum amplitudo propria distinctio est qua G. africana a G. complici differt, cujus conidiae cellula in basi posita minor quam altera in apice.

G. africanae conidiae paribus intervallis in ampulla conidiogena longis denticulis inseratae : hi autem denticuli eo longiores, quo conidiae minus evolutae sunt.

Differt etiam ab Arthrobotrys, G. africana quod ejus conidiae ut maxime bicellulariae sunt, et nunquam foveas ferunt. Cellulae autem ad contactum ei crescunt, si adsunt Alternariae alternatae.

Clef pour les espèces du genre *Gonatobotrys*

1 Conidie unicellulaire . . . . *Gonatobotrys simplex*
1 Cellules conidiennes dissymétriques ou au plus égales 2
  2 Cellule proximale réduite . . . . *Gonatobotrys complex*
  2 Cellule proximale développée . . . . *Gonatobotrys africana*

II - Aspects physiologiques

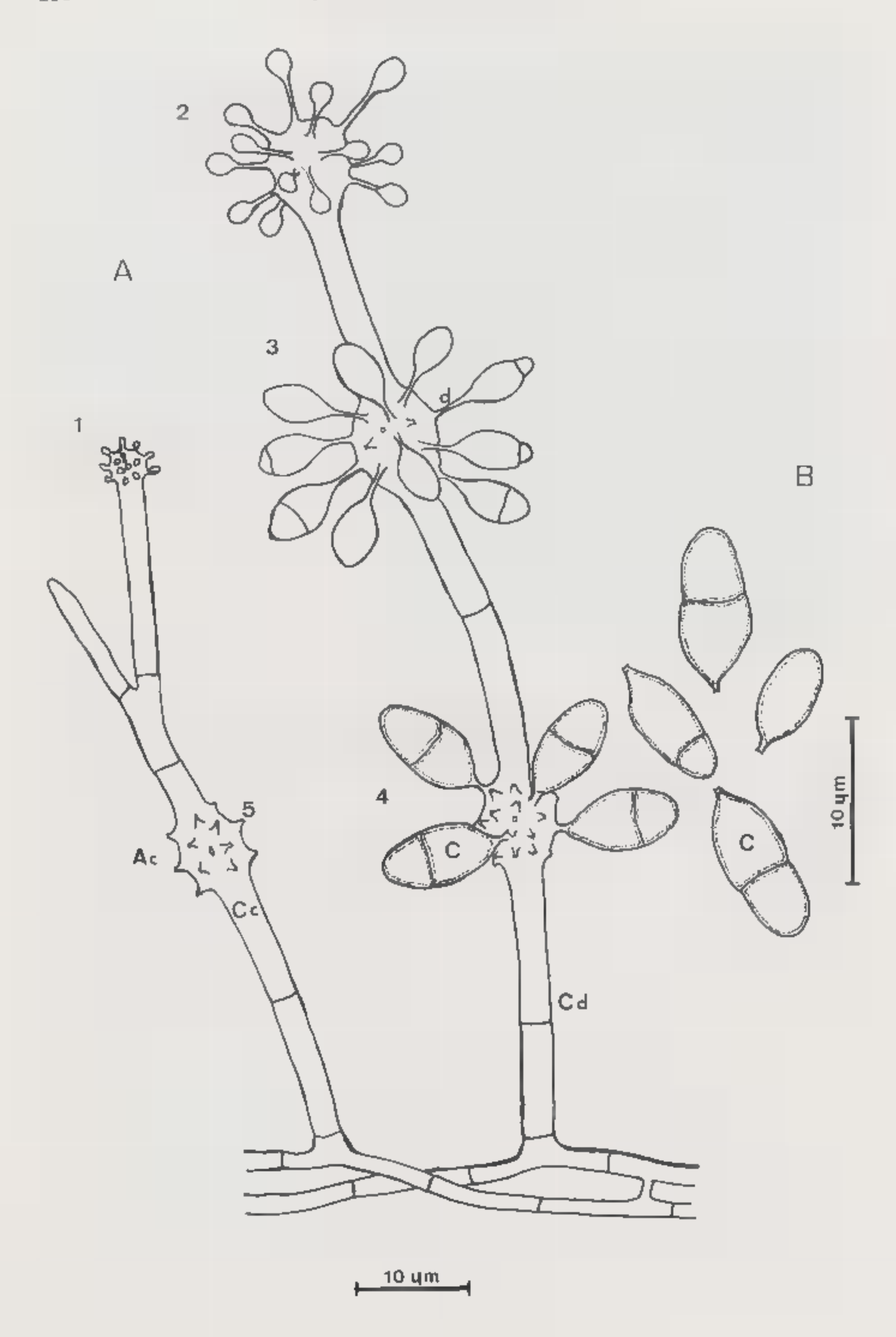
Les souches de *G. simplex* que nous avons observées ont été récoltées en compagnie d'*Alternaria alternata* et de *Cladosporium herbarum* comme cela a été déjà décrit par WHALEY & BARNETT (1963) et WALKER & MINTER (1981), mais aussi en présence du *Stemphylium* et sa forme parfaite, le *Pleospora herbarum*. Par contre nous n'avons pas observé, durant nos recherches, l'association *Gonatobotrys - Paecilomyces* (WHALEY & BARNETT, 1963; WALKER & MINTER, 1981).

Au Maroc l'*Alternaria alternata* et le *Cladosporium herbarum* sont les espèces les plus fréquemment parasitées.

Le *G. africana* que nous avons observé parasite les mêmes espèces que le *G. simplex* et selon le même processus : le parasite émet, en direction de l'hôte, de courts filaments terminés par une cellule de contact (WHALEY & BARNETT, 1963) (Pl. I, fig. 5). C'est au niveau de l'interface entre les cellules de contact du parasite et les cellules de l'hôte que HOCH (1977) a montré l'existence de plasmodesmes.

Planche III : *Gonatobotrys africana*. — Fig. 1 : Microscopie photonique; aspect général du thalle. Fig. 2 : M.E.B., cellules conidiogènes (Cc) dont la surface est hérissée de denticules formées à la chute des conidies (C). Fig. 3, 4 et 5 : Cellules conidiogènes (Cc) de forme irrégulière et réparties à intervalles réguliers sur le conidiophore (Cd), d'où partent parfois des ramifications (fig. 4).

Plate III : *Gonatobotrys africana*. — Fig. 1 : General aspect of the thallus. Fig. 2 : SEM, denticulate conidiogenous cells. Fig. 3, 4 and 5 : Irregular conidiogenous cells regularly distributed on the conidiophore, with some ramifications (fig. 4).


2
A
3
d
1
B
4
5
Ac
C
C
10 µm
Cc
Cd
10 µm

WHALEY & BARNETT (1963) ont montré que le *G. simplex* ne peut se développer en l'absence d'une substance, qu'ils ont appelé facteur de croissance ou «mycotrophéine», que le parasite trouve naturellement dans les cellules de l'hôte. Ces auteurs ont montré, dans le même rapport, que ce facteur de croissance est produit, plus ou moins intensément, par beaucoup d'espèces fongiques, en particulier une espèce qui n'est pas parasitée par *G. simplex* : *Arthrobotrys musiformis*. C'est cette espèce qu'ils ont utilisée pour réaliser un extrait cellulaire, contenant le facteur de croissance, qu'il est nécessaire d'ajouter au milieu de culture afin d'obtenir *G. simplex*.

A la différence de WHALEY & BARNETT (1963), nous avons pu obtenir le développement de certaines conidies de *G. simplex* et *G. africana* en l'absence de facteur de croissance, mais seulement dans le cas où les conidies repiquées, du *G. simplex* ou du *G. africana*, proviennent de culture effectuée en présence de l'hôte ou de l'extrait cellulaire de l'hôte. On observe alors que certaines de ces conidies produisent un filament formé de 4 à 5 cellules et terminé par une cellule conidiogène, réalisant ainsi un microcycle (Pl. I, fig. 4). Si on repique les conidies ainsi formées, celles-ci ne se développent qu'en présence de l'hôte ou de l'extrait cellulaire de l'hôte. Il semble donc, que lorsque le *Gonatobotrys* sp. est cultivé en présence de facteur de croissance (provenant de l'hôte ou d'un extrait cellulaire), certaines conidies formées emmagasinent une quantité minimale de cette substance, leur permettant d'assurer une fois repiquées, un développement végétatif réduit mais toutefois conidiogène de type microcycle (Pl. I, fig. 4). D'autres conidies, par contre, parviennent seulement à émettre quelques bourgeons leur donnant un aspect lévuriforme (Pl. I, fig. 4); ces conidies n'ont vraisemblablement pas accumulé suffisamment de substance de croissance durant leur formation.

Le développement du *G. simplex* ou de *G. africana* en présence d'extrait d'*Alternaria* sp. est très comparable au développement de ces espèces en présence de leur hôte naturel. Toutefois, nous avons pu constater que ce développement devient d'autant moins important (tant sur le plan de la croissance végétative que sur le plan de la sporulation) que le nombre de repiquage sur le milieu additionné d'extrait augmente. Il semble donc que le contact avec l'hôte favorise la capacité de développement du parasite.

Enfin, nous avons pu constater qu'un milieu «riche» (extrait de levure, glucose, agar) favorise plutôt la croissance végétative, alors qu'un milieu plus «pauvre» (extrait de malt, agar) favorise la sporulation.

Planche IV : *G. africana*. — A : Aspect des conidiophores. 1, 2, 3 et 4 : différents stades de développement des conidies. 5 : Ampoule conidiogène après la chute des conidies. Ac : ampoule conidiogène. Cc : Cellule conidiogène. Cd : Conidiophores. C : Conidies. d : denticule. B : Détail de quelques conidies.

Plate IV : *G. africana*. — A : Conidiophores. 1, 2, 3 and 4 : different stages in development of conidia. 5 : Conidiogenous bulbs. B : Some conidia.

REMERCIEMENTS

Nous remercions la FIS (Fondation Internationale pour la Science) pour le soutien financier qu'elle apporte à ce projet. Nos remerciements vont aussi à M. AMBLARD de GUERRY, pour la partie latine de ce texte.

Nous remercions également MM. M. BEN CHERKI et S. KHAMOUSS pour leur assistance technique.

BIBLIOGRAPHIE

ALI M.I., 1975 – The family Moniliaceae in Egypt. 1. *Gonatobotrys simplex* Corda. *Publ. Cairo Univ. Herb.* 6 : 1-6.

CHABERT J., 1968 – Les spores de champignons dans l'air de Rabat (Maroc) : Aperçu floristique et écologique. Applications allergologiques et pathologiques possibles. *Bull. Soc. Sci. Nat. Phys. Maroc* 48 : 1-48.

CHABERT J. et NICOT J., 1968 – Notes d'Aérobiologie. II. Micromycètes de l'air de Rabat; contribution à l'établissement d'un catalogue mycologique du Maroc. *Bull. Soc. Mycol. France* 84 : 475-483.

HOCH H.C., 1977 – Mycoparasitic relationships : *Gonatobotrys simplex* parasit on *Alternaria tenuis. Phytopathology* 67 : 309-314.

WALKER J.C. and MINTER D.W., 1981 – Taxonomy of *Nematogonum, Gonatobotrys, Gonatobotrym* and *Gonatobotriella. Trans. Brit. Mycol. Soc.* 77 : 299-319.

WHALEY J.W. and BARNETT H.L., 1963 – Parasitism and nutrition of *Gonatobotrys simplex. Mycologia* 55 : 199-210.